

Rec'd PCT/PTO 07 FEB 2005 #2

PATENTTI- JA REKISTERIHALLI
NATIONAL BOARD OF PATENTS AND REGISTRATION

FI/103/00596
22 AUG 2003

Helsinki 11.8.2003

REC'D 01 SEP 2003

WIPO PCT

ETUOIKEUSTODISTUS
PRIORITY DOCUMENT



Hakija
Applicant

1. Korkeamäki, Mika, Pöytyä
2. Vaahtovuo, Jussi, Turku

Patenttihakemus nro
Patent application no

20021451

Tekemispäivä
Filing date

07.08.2002

Kansainvälinen luokka
International class

C12Q

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Menetelmä bakteerien tunnistamiseksi"

Hakemus on hakemusdiaariin 19.06.2003 tehdyn merkinnän mukaan siirtynyt Cyflo Oy:lle, kotipaikka Tampere.

The application has according to an entry made in the register of patent applications on 19.06.2003 been assigned to Cyflo Oy, Tampere.

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä Patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista, tiivistelmästä ja piirustuksista.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims, abstract and drawings originally filed with the Finnish Patent Office.

Pirjo Kaila
Tutkimussihteeri

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Maksu 50 €
Fee 50 EUR

Maksu perustuu kauppa- ja teollisuusministeriön antamaan asetukseen 1027/2001 Patentti- ja rekisterihallituksen maksullisista suoritteista muutoksineen.

The fee is based on the Decree with amendments of the Ministry of Trade and Industry No. 1027/2001 concerning the chargeable services of the National Board of Patents and Registration of Finland.

Osoite: Arkadiankatu 6 A Puhelin: 09 6939 500
P.O.Box 1160 Telephone: + 358 9 6939 500
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

Telefax: 09 6939 5328
Telefax: + 358 9 6939 5328

MENETELMÄ BAKTEERIEN TUNNISTAMISEKSI – FÖRFARANDE FÖR IDENTIFIERING AV BAKTERIER

- 5 Keksinnön kohteena on menetelmä yhden tai useamman bakteerin ja/tai bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä sekä mainitun menetelmän käyttö.

TEKNIIKAN TASO

- 10 Bakteerien lajispesifinen tunnistaminen ja laskenta sekabakteerinäytteestä on nykyisin käytössä olevilla menetelmillä työlästä ja hidasta. Sekabakteerinäytteellä tarkoitetaan tässä yhteydessä useita eri bakteerilajeja sisältävää näytettä. Tyypiesimerkkejä sekabakteerinäytteistä ovat uloste ja jätevesi. Ihmisulosteen on todettu sisältävän 300-400 eri bakteerilajia ja bakteeritiheys näytteessä on luokkaa 10^{11} bakteerisolua per gramma näytettä (Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians; W. E. C. Moore and L. V. Holdeman, Applied Microbiology, 15 1974, vol. 27, p. 961-979). Käyttökelpoisin tämänhetkinen menetelmä bakteerilajien tunnistamiseksi ja laskemiseksi sekabakteerinäytteestä on fluoresenssimikroskopiaa hyödyntävä mikroskopia-FISH (Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces; H. J. M. Harmsen et al., Applied and Environmental Microbiology, 2002, vol. 68, p. 2982-2990).
- 20 Lyhenne FISH tulee sanoista Fluorescence In Situ Hybridization. FISH on yleisesti käytössä oleva molekyylibiologinen tekniikka, jossa tunnistettavan solun nukleiinihapposekvenssiin liitetään eli hybridisoidaan sekvenssispesifinen koetin. Koetin on määrätyn emäsjärjestyksen omaava lyhyt nukleiinihappoketju, joka solun sisään saatettuna liittyy vastinemäksiinsä. Koettimen spesifisyys perustuu koettimen emässekvenssin ja vastinemässekvenssin yhteensopivuuteen. Bakteriologisessa FISH-tekniikassa käytettävien koettimien kohdesekvensseinä ovat bakteerien ribosomien 16S rRNA- tai 23S rRNA-rakenneyksiköiden nukleiinihapot. Koetin sitoutuu hybridisaatiossa kohdesolun sekvenssiin vain, mikäli koettimen ja kohdesolun 16S rRNA:n tai 23S rRNA:n sekvenssin muodostavat emäkset ovat yhteensopivia. 16S rRNA- ja 23S rRNA-molekyylejä koodittavat geenialueet ovat bakteerien evoluution kehittyessä pysyneet lähes muuttumattomina. Ko. geenit ja ribosomien rakenne ovat sekvenssiltään samankaltaisia sellaisilla bakteerilajeilla, jotka ovat evoluutiohistorialtaan lähekkäisiä. 16S tai 23S rRNA:han sitoutuvat koettimet voidaan tämän vuoksi valmistaa sellaisiksi, että ne sitoutuvat vain joidenkin, toisilleen sukua olevien bakteeriryhmien 16S rRNA- tai 23S rRNA-

nukleiinihapposekvensseihin (Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation; R. I. Amann et al., Microbiological Reviews, 1995, vol. 59, p. 143-169). Täten voidaan luoda esim. *Bifidobacterium*-suvulle spesifinen koetin. 16S rRNA-hybridisaatiossa koettimen sekvenssille sopivia 16S rRNA-molekyylejä on yhdessä bakteerisolussa muutamasta sadasta muutamiin tuhansiin kappaletta, joten koettimien määrän ollessa riittävä koettimia sitoutuu satoja tai tuhansia yhteen bakteerisoluun.

FISH-tekniikassa hybridisoituneen bakteerin tunnistus perustuu siihen, että koettimeen on liitetty fluoresoiva molekyyli eli fluorokromi. Fluorokromit virittyvät absorboidessaan energiaa niille luonteenomaisen absorbanssispektrin aallonpituuksilla. Viritystilan syntyminen edellyttää, että fluorokromimolekyylin elektroni(t) absorboi eli vastaanottaa energiakvantin ja siirtyy ulommalle elektronikuorelle. Kun viritystila purkautuu, elektroni emittoi eli luovuttaa energiakvantin ja palaa perustilaansa. Kunkin fluorokromin absorbanssispektrissä on absorptiomaksimi eli se aallonpituus, jota fluorokromi absorboi eniten. Viritystilan purkautuessa fluorokromit emittoivat viritysaallonpituutta pidempiaallonpitoisia fotoneja eli ne fluoresoivat. Myös emittoidun valon aallonpituudet muodostavat jakauman eli emissiospektrin. Emissiospektrin emissiomaksimi on se aallonpituus, jota fluorokromi emittoi eniten. Absorptio- ja emissiomaksimien eroa sanotaan Stokesin siirtymäksi. Tyypillinen FISH-menetelmässä käytetty fluorokromi on fluoreskaiini, jonka absorptiomaksimi on 494 nm, emissiomaksimi 520 nm ja Stokesin siirtymä täten 26 nm (Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes). Historiallisista syistä fluoreskaiini on käytetyin fluorokromi ja sitä käytetään yleisesti referenssifluorokromina. Käytön haittapuolia ovat suhteellisen nopea intensiteetin aleneminen (photobleaching), joka vaikeuttaa mikroskopia-FISH -menetelmässä bakteerien laskentaa. Lisäksi fluoreskaiinin emittoiman valon intensiteetin pH-herkkyys hankaloittaa sen käyttöä monissa sovelluksissa ja hidastaa reagenssien valmistusta. Fluoreskaiinilla on myös laaja emissiospektri, mikä vaikeuttaa sen käyttöä useita fluorokromeja hyödyntävissä sovelluksissa. Yleensä mikroskopia-FISH-menetelmässä näytettä valaistaan laajan aallonpituusspektrin omaavalla valonlähteellä, jolloin koettimiin sidotut leimat virittyvät ja emittoivat valoa emissiospektrinsä aallonpituuksien suhteessa. Kun näytettä tarkastellaan mikroskopia-FISH:ssä käytettävällä fluoresenssi-mikroskoopilla sopivan aallonpituussuodattimen läpi, ainoastaan hybridisoituneet bakteerit näkyvät emittoivina partikkeleina eli vaaleina pisteinä tummassa mikroskoopin näkökentässä.

FISH-tekniikkaan yhdistetään yleisesti DNA-värjäys näytteessä olevien kaikkien bakteerien eli kokonaisbakteerimäärän laskemiseksi. Luonnon sekabakteerinäytteet sisältävät bakteerien lisäksi aina myös ei-bakteeriperäistä materiaalia. Esimerkkeinä voidaan mainita ulosteen kuidut ja jätevesien epäorgaaniset materiaalit. Käytettävät

- 5 DNA-värit ovat yleisesti DNA:n kaksoiskiarteeseen interkalatoituvia fluorokromeja, joiden intensiteetti kasvaa moninkertaiseksi sitoutumisen seurauksena. Esimerkkejä DNA-väreistä ovat propidiumjodidi ja etidiumjodidi. DNA-värit sitoutuvat myös hybridisoituihin bakteereihin. Jotta koettimella hybridisoituneet bakteerit voidaan erottaa kaikkien DNA-värjäytyneiden bakteerien joukosta eri värisinä, on DNA-
- 10 värin emissiospektrin erottava koettimeen liitetyn fluorokromin emissiospektristä. Usein myös DNA-värin absorptiospektri poikkeaa koettimen värin absorptiospektristä. Käyttämällä DNA-värjäystä FISH:n yhteydessä saadaan hybridisoituneet ja DNA-värjäytyneet kohdebakteerit erotettua vain DNA-värjäytyneistä näytteen muista bakteereista ja DNA-värjäytymättömistä DNA:ta
- 15 sisältämättömistä partikkeleista.

Mikroskopia-FISH-menetelmässä hybridisoitu sekabakteerinäyte tutkitaan fluoresenssimikroskoopilla. Tässä menetelmässä mikroskooppilasille kiinnitettyä näytettä valaistaan laajan aallonpituusspektrin omaavalla valonlähteellä, jolloin näytteessä olevat fluorokromit absorboivat energiaa ja emittoivat valoa

20 emissiospektrinsä aallonpituusjakauman mukaisesti. Näytteen tarkastelu tapahtuu näytteestä heijastuvan valon eri aallonpituuksia suodattavien optisten komponenttien läpi. Hybridisoitujen bakteerien määrän laskemiseen käytetään suodatinta, joka päästää läpi vain koettimen fluorokromin emittoimaa valoa. Bakteerien kokonaismäärän laskemiseen käytetään suodatinta, joka päästää läpi

25 vain DNA-värin emittoimaa valoa. Tietämällä näytteen kohdebakteerien määrä ja kokonaisbakteerien määrä saadaan kohdebakteerien osuus laskettua.

Mikroskopia-FISH-menetelmän heikkouksia ovat sen hitaus ja tulosten tulkinnanvaraisuus epäspesifisen hybridisaation vuoksi. Epäspesifisessä hybridisaatiossa hybridisoitava koetin tarttuu muiden kuin varsinaisten kohdebakteerien nukleiinihappoihin ja jopa bakteerien pintarakenteisiin. Bakteeriin epäspesifisesti hybridisoituneen koettimen määrä on yleensä vähäisempi kuin koettimen määrä varsinaisissa hybridisoituneissa kohdebakteereissa, mutta vähäinenkin koetinmäärä saa bakteerin näkymään taustaansa vaaleampana. Tämä aiheuttaa tulkinnan vaikeutta mikroskopia-FISH:ssä. Menetelmän hyvin hallitseva

30 henkilö pystyy laskemaan enintään joitakin tuhansia bakteerisoluja tunnissa. Sekabakteerinäytteiden sisältämästä valtavasta bakteerimäärästä saadaan

35

kohtuullisella ajankäytöllä laskettua hyvin pieni osa, joten otosjoukko jää pieneksi (Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation; R. I. Amann et al., Microbiological Reviews, 1995, vol. 59, p. 143-169). Näistä syistä mikroskopia-FISH-menetelmällä saatujen tulosten toistettavuus jää usein huonoksi.

Mikroskopia-FISH:n heikkouksien vuoksi sen tilalle on pyritty kehittämään nopeampia ja luotettavampia menetelmiä. Yhtenä ratkaisuvaihtoehtona on esitetty menetelmä, jossa mikroskoopin okulaareihin on kiinnitetty video- tai digitaalikamera. Kameran kuvaamat kuvat on analysoitu tietokoneistetulla kuvankäsittelyohjelmalla, joka tunnistaa kustakin kuvasta säädettyä kirkkausrajaa kirkkaammat partikkelit ja laskee nämä tutkittaviksi bakteereiksi (Automatic signal classification in fluorescence in situ hybridization images; B. Lerner et al., Cytometry, 2001, vol. 43, p. 87-93). Tällä menetelmällä saadaan analyysinopeutta lisättyä hieman, mutta näytteen analysointi on edelleen melko hidasta. Aivan kuten ihmisvoimin tehdyssä mikroskopia-FISH:ssä, koneellisen mikroskopia-FISH:nkin ongelma on tunnistettavan kirkkausrajan määrittäminen ja epäspesifisesti hybridisoituneiden bakteerien erottaminen hybridisoituneista kohdebakteereista. Koneellinen mikroskopia-FISH ei ole levinnyt laajaan käyttöön.

Virtausytometria on jo vuosikymmeniä käytössä ollut menetelmä, jolla voidaan analysoida ja laskea nesteessä olevia partikkeleita hyvin nopeasti. Monet partikkelit voidaan suspensoida liuokseksi. Virtausytometrian avulla saadaan näytteen partikkeleista mitattua useita parametreja samanaikaisesti. Virtausytometriaa käytetään useissa erilaisissa kliinisissä ja teollisissa sovelluksissa, erityisesti biolääketieteen alalla. Virtausytometria on nykyään tärkein nestemäisten eukaryoottisolunäytteiden kvalitatiivinen tunnistus- ja laskentamenetelmä. Mm. ihmisen veren valkosoluja tutkitaan rutiinomaisesti automatisoiduilla virtausytometreilla. Sen sijaan prokaryoottisolujen eli bakteerien virtausytometriset analyysimenetelmät eivät ole levinneet laajaan käyttöön. Virtausytometriaan perustuvien bakteriologisten analyysi- ja laskentamenetelmien yleistymisen esteenä on ollut virtausytometrialaitteiden tekniikan ja virtausytometrian osaamisen taso, joka ei ole sallinut eukaryoottisolujen huomattavasti pienempien prokaryoottisolujen luotettavaa analyysiä. Viimeisten kymmenen vuoden aikana virtausytometrialaitteistojen kehittymisen myötä virtausytometriaan perustuvia menetelmiä bakteerien analysoimiseksi on kuitenkin julkaistu (Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses; H. M. Davey and D. B. Kell,

Microbiological Reviews, 1996, vol. 60, p. 641-696). Tällä hetkellä tunnetut menetelmät eivät ole soveliaita rutiinikäyttöön eikä niillä voida laskea sekabakteerinäytteiden bakteerikonsentraatioita. Myöskään analysoidut näytteet eivät ole olleet ulosteen kaltaisia lajikirjoltaan tuntemattomia sekabakteerinäytteitä.

- 5 Esitetyt menetelmät bakteerien tunnistamiseksi virtaussytometrillä eivät perustu virtaussytometrin ja fluoresoivien hybridisaatiokoettimien yhtäaikaiseen käyttöön (esimerkiksi julkaisut US 2002/076,743, US 6,165,740, DE 19608320, EP 304 501, DE 19945553, EP 337 189). Tieteellisissä artikkeleissa on perehdytty lähinnä yhtä bakteerilajia sisältävien puhdasviljelmänäytteiden analysointiin, tutkittu
- 10 bakteerien ja veren valkosolujen interaktioita, bakteerien aineenvaihduntaprosesseja ja lisääntymistä sekä erotettu eläviä bakteereja kuolleista (Analysis of bacterial function by multi-color fluorescence flow cytometry and single cell sorting; G. Nebe-von-Caron et al., Journal of Microbial Methods, 2000, vol. 42, p. 97-114). Sekabakteerinäytteiden virtaussytometristä tutkimista on kokeiltu käyttämällä
- 15 bakteereihin tarttuvia vasta-aineita (Multiparameter flow cytometry of bacteria: implications for diagnostics and therapeutics; H. M. Shapiro, Cytometry, 2001, vol. 43, p. 223-226, ja Detection of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in seed extracts of *Brassica* sp. applying fluorescent antibodies and flow cytometry; L. G. Chitarra et al., Cytometry, 2002, vol. 47, p.
- 20 118-126, ja D. Vealin patentti US6225046, ja L. Terstappenin patentti EP0347039). Vasta-aineiden käyttöön perustuneet menetelmät eivät kuitenkaan ole mahdollistaneet luotettavaa sekabakteerinäytteiden lajispesifistä tutkimista, koska vasta-aineet eivät ole bakteerilajispesifisiä. Vasta-aineet tarttuvat bakteerien pintarakenteisiin, jotka eivät ole laji- tai sukuspesifisiä, ja voivat sitoutua siis useisiin erilaisiin bakteerilajeihin.. Samoja pintarakenteita on löydetävissä hyvin erilaisista bakteereista ja toisaalta samakantaisilla bakteereilla voi olla hyvin erilaisia pintamolekyylejä (What determines arthritogenicity of a bacterial cell wall?; X. Zhang, väitöskirja, 2001, Turun yliopisto).

- Virtaussytometrin tärkeimmät komponentit ovat paineistettu
- 30 näytteensyöttöjärjestelmä, laser ja signaalintunnistuslaitteisto. Virtaussytometrillä tutkittavista partikkeleista saatu tieto analysoidaan virtaussytometriin liitettyllä tietokoneella. Virtaussytometrin paineistettu näytteensyöttöjärjestelmä pumppaa tutkittavaa näytettä näytteensyöttöneulaan. Näytteensyöttöneulan päässä olevasta reiästä näyte virtaa virtauskammioon, joka sisältää vaippanestettä. Vaippanesteenä
- 35 käytetään optisilta ominaisuuksiltaan näyteliuoksen kaltaista nestettä. Näytteensyöttöneulasta tullutta ohutta näyteliuosvirtaa ympäröivä vaippaneste pakottaa näyteliuosvirrassa olevat partikkelit erilleen toisistaan ja yhtenäiseksi

jonoksi. Tapahtumaa kutsutaan hydrodynaamiseksi fokusoinniksi. Partikkelijono on kohdistettu virtaussytometriin kuuluvan laserin kanssa siten, että lasersäde kohtaa partikkelit suorassa kulmassa. Näytteensyöttölaitteiston ja laserin lisäksi kolmas virtaussytometrin keskeinen laitteistokomponentti on signaalintunnistuslaitteisto.

5 Tutkittavassa näytteessä olevat partikkelit aiheuttavat lasersäteen siroamista. Lasersäteen siroaminen laserin kulkusuunnassa pienissä kulmissa tunnistetaan fotodiodilla laserin tulosuuntaa vastaan. Siroamiskulman suuruutta mitataan Forward Scatter -parametrina (FSC). Laserin siroamista suuremmissa kulmissa kulkusuuntaansa nähden mitataan Side Scatter -parametrina (SSC)

10 valomonistinputkella. FSC korreloi karkeasti tunnistettavien partikkelien kokoon siten, että suuret lasersäteeseen osuneet partikkelit sirottavat lasersädettä enemmän kuin pienet. SSC-parametri korreloi partikkelin muotoon ja jyväisyyteen. SSC- ja FSC-detektorien lisäksi signaalintunnistuslaitteistoon kuuluu valomonistinputkia näytteestä tulevan fluoresenssin tunnistamiseksi. Laserin korkeaenergiset fotonit

15 virittävät tutkittavissa partikkeleissa olevia fluorokromeja. Fluorokromien viritystilan purkautuessa ne emittoivat valoa emissiospektriensä mukaisesti. Fluoresenssi mitataan sopivaa aallonpituutta tunnistavilla valomonistinputkilla. Fluoresenssidetektorit sijaitsevat laseriin nähden yleensä samassa suunnassa kuin SSC-detektori. Emittoitunut valo rekisteröidään sopivaa aallonpituutta tunnistavilla

20 valomonistinputkilla suorassa kulmassa laserin ja nestevirran tulosuuntiin nähden.

Tavallisimmissa virtaussytometreissä fluoresenssia tunnistetaan neljällä valomonistinputkella, joiden lyhenteet ovat vastaavasti FL1, FL2, FL3 ja FL4. FL-detektorien valoteille asetetuilla aallonpituussuodattimilla saadaan kukin detektori vain määrätyn aallonpituusalueen tunnistavaksi. Tutkittavien partikkelien erottamiseksi laitteiston taustakohinasta ja näyteliuoksen epäpuhtauksista voidaan määrittää kynnyсарvo yhdelle tai useammalle sironta- tai fluoresenssikanavalle. Mikäli partikkeli aiheuttaa ko. kanavalla (kanavilla) kynnyсарvon ylittävän signaalin, virtaussytometrin elektroniikka mittaa kyseisen partikkelin parametrit.

Mikäli partikkelin kynnyсарvokanavalla aiheuttama signaali alittaa kynnyсарvon, partikkelin parametrit jätetään mittaamatta. Kynnyсарvot tulisi asettaa siten, että tutkittavia partikkeleita ei jää mittaamatta eli analysoitava otos on edustava eikä vääristynyt. Virtaussytometrin eri detektoreilta kerätyt signaalit johdetaan signaalinkäsittelylaitteistoon ja saatu tieto analysoidaan tietokoneohjelman avulla. Tutkittavan näytteen sisältämät partikkelit esitetään yleisimmin kaksiulotteisessa pistekuvaajassa, jossa kummallakin akselilla on jokin tunnistusparametreista: FSC, SSC tai jokin fluoresenssikanavista. Tunnistetut partikkelit esitetään kuvaajassa pisteinä, jolloin samantyyppiset partikkelit muodostavat pisteryhmiä eli populaatioita. Pistekuvaajaa käytettäessä on näytteestä mahdollista analysoida vain

kahta muuttujaa kerrallaan. Mikäli halutaan erotella populaatioita useamman kuin kahden muuttujan perusteella, täytyy analyysi suorittaa useammassa pistekuvaajassa.

Merkittävä ero mikroskopiaan ja virtaussytometriaan perustuvien FISH-sovellusten välillä on näytteessä olevien fluorokromien virittämiseen käytetyn valonlähteen erilaisuus. Mikroskopia-FISH:ssä näytettä valaistaan laajaspektrisellä valolla, joka kykenee virittämään usean eri viritysaallonpituuden omaavia fluorokromeja samanaikaisesti. Aallonpituussuodatinta vaihtamalla samasta näytteestä voidaan kulloinkin laskea halutun fluorokromin sisältävä bakteeripopulaatio.

Virtaussytometriassa fluorokromien virittäminen tapahtuu usein yhtä aallonpituutta sisältävällä laserilla. Mikäli yhdellä laserilla varustetulla virtaussytometrillä tutkitaan kahta tai useampaa fluorokromia samanaikaisesti, on käytettävien fluorokromien oltava sellaisia, että ne virittyvät samalla aallonpituudella, mutta niiden emissiot eroavat siten, että kukin populaatio voidaan tunnistaa omalla FL-detektorillaan. Tällaisten fluorokromiyhdistelmien käyttö on yleistä eukaryoottisolunäytteiden analyysissä, mutta toimivia FISH-tekniikkaan sopivia fluorokromiyhdistelmiä ei tunneta (Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes). Käytännössä tämä on tarkoittanut sitä, että virtaussytometria-FISH:llä ei ole ollut mahdollista erottaa ja laskea koettimella hybridisoitunutta ja DNA-värjäytynyttä kohdepopulaatiota vain DNA-värjäytyneestä näytteen muut bakteerit sisältävästä populaatiosta sekä ei-bakteeriperäisten partikkelien muodostamasta taustapopulaatiosta samassa analyysissä.

Tähänastisissa, vain tieteelliseen tutkimuskäyttöön soveltuvissa, virtaussytometria-FISH -menetelmissä 16S rRNA-hybridisoituneen kohdepopulaation erottaminen näytteen muista bakteereista ja taustapopulaatiosta on perustunut useaan eriaikaiseen analyysiin sekä muiden kuin fluoresenssiparametrien käyttöön. Näytteen sisältämien bakteerisolujen määrää ja hybridisoituneiden kohdebakteerien osuutta ei ole voitu laskea samassa analyysissä. Toistaiseksi parhaassa virtaussytometria-FISH -menetelmässä kohdebakteerit on fluoresenssin erotuskyvyn lisäämiseksi hybridisoitu kahdella eri koettimella (Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples with fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA targeted probes; E. G. Zoetendal et al., väitöskirjassa Molecular characterization of bacterial communities in the human gastrointestinal tract, 2001, E. G. Zoetendal, Wageningenin yliopisto, Hollanti). Koettimet on leimattu erilaisilla fluorokromeilla,

jotka näkyvät eri fluoresenssikanavilla. Koettimien fluorokromien viritys- ja emissioaallonpituusspektrit ovat niin kaukana toisistaan, että fluorokromien virittäminen ei enää onnistu yhdellä laserilla, vaan joudutaan käyttämään kahta eri aallonpituuden laseria, joiden säteet osuvat näytteen partikkeleihin eri aikaan. Tässä menetelmässä kumpaakin laseria joudutaan käyttämään kohdepopulaation erottamiseen näytteen muista bakteereista. Samoin pistekuvaajan kummatkin akselit käytetään kohdepopulaation erottamiseen näytteen muista bakteereista eikä kokonaisbakteeripopulaation samanaikainen erottaminen taustapopulaatiosta ole mahdollista. Kokonaisbakteerimäärän laskemista varten joudutaan tekemään toinen analyysi, jossa näyte ei ole hybridisoitu vaan ainoastaan DNA-värjätty. Zoetendalin menetelmässä myös kohdepopulaation erottuminen näytteen muista bakteereista jää heikoksi mm. menetelmässä käytettyjen fluorokromien heikon intensiteetin ja suuren taustan vuoksi.

Toisessa käytössä olevassa sovellusvaihtoehdossa kohdepopulaatio on hybridisoitu yhdellä koettimella, jossa on yksi fluorokromi (Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes; G. Wallner et al., Applied and Environmental Microbiology, 1995, vol. 61, p 1859-1866). DNA:ta sisältävien partikkelien erottamiseksi DNA:ta sisältämättömistä partikkeleista hybridisoitu näyte on värjätty DNA-värillä, joka ei ole viritettävissä samalla laserilla kuin koettimen fluorokromi, joten tässäkin menetelmässä käytetään kahta laseria. Tavoitteena Wallnerilla on ollut kohdebakteeripopulaation, näytteen muiden bakteerien ja taustapopulaation samanaikainen erottaminen samassa kuvaajassa. DNA-väriksi Wallner on valinnut ultraviolettiaallonpituusalueen valoa absorboivan ja emittoivan fluorokromin (Hoechst Blue, Molecular Probes) ja koettimeen liitetty fluorokromi on sinivihreän aallonpituusalueen fluoresskaiini. Vaikka menetelmässä on käytetty hyvin voimakkaita ja kalliita, satojen milliwattien tehoisia vesijähdytteisiä lasereita, käytettyjen fluorokromien intensiteetti jää heikoksi ja populaatioita ei voida tyydyttävästi erottaa toisistaan yhdessä analyysissä. Erottaakseen DNA-värjäytyneet partikkelit DNA-värjäytymättömistä partikkeleista Wallner joutuu käyttämään ylimääräistä sovellusohjelmaa, joka jättää DNA-värjäytymättömät partikkelit kokonaan analyysin ulkopuolelle eikä DNA-värjäytyneitä ja DNA-värjäntymättömiä partikkeleita saada samaan pistekuvaajaan. Tämä heikentää menetelmän luotettavuutta. Wallner ei myöskään laske bakteerien konsentraatiota tilavuusyksikköä kohden, vaan ainoastaan bakteerilajien suhteellisia osuuksia.

Kolmas tieteellisissä julkaisuissa esitetty virtaussytometrinen menetelmä 16S rRNA-hybridisoitujen sekabakteerinäytteiden analysoimiseksi perustuu yhden laserin ja sille sopivien DNA-värin ja koettimeen liitetyn fluorokromin käyttöön (Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations; R. Amann et al., Applied and Environmental Microbiology, 1990, vol. 56, p. 1919-1925). Tässäkään menetelmässä koettimissa käytettyjen fluorokromien fluoresenssin matala intensiteetti ei mahdollista kohdebakteerien eli analysoitavien bakteerien erottumista näytteen muista bakteereista. Käytetyn DNA-värin absorptiomaksimi on samalla aallonpituusalueella kuin koettimen fluorokromin emissiomaksimi. Kohdebakteereita näytteen muista bakteereista erottava koettimen fluorokromi kuluttaa emissioenergiaansa DNA-värin virittämiseen eikä kohdebakteerien fluoresenssi riitä niiden luotettavaan erottumiseen näytteen muista bakteereista. Mikäli DNA-väri ja fluorokromilla leimattu koetin ovat sitoutuneet riittävän lähelle toisiaan, voi näiden välinen energiansiirto tapahtua myös suoraan molekyylien välisenä energiansiirtona ilman fotoneja esimerkiksi FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) -ilmiönä (Use of phycoerythrin and allophycocyanin for fluorescence resonance energy transfer analyzed by flow cytometry: Advantages and limitations; P. Batard Cytometry, 2002, vol. 48, p. 97-105). Kohdebakteeripopulaatio ja näytteen muiden bakteerien muodostama populaatio jäävät pistekuvaajalla päällekkäiseksi eikä bakteerisolujen lukumäärää ja kohdebakteerien osuutta näytteen kokonaisbakteerimäärästä voida laskea.

Kuten edellä on esitetty, Zoetendalin, Wallnerin kuin Amannin menetelmissä kaikkia kolmea populaatioita: kohdebakteereita, näytteen muita bakteereita ja DNA-värjäytymättömiä partikkeleita ei saada luotettavasti erottumaan. Näytteen bakteerikonsentraatiota ja kohdebakteerien osuutta ei saada laskettua luotettavasti. Nämä menetelmät eivät siis sovellu monimutkaisten sekabakteerinäytteiden kuten ulosteen bakteerikonsentraatioiden laskemiseen sekä yksittäisten bakteerilajien spesifiseen ja luotettavaan tunnistamiseen ja laskemiseen. Tämän seurauksena virtaussytometriset sekabakteerinäyteanalyysit ovat olleet epäluotettavia ja mikroskopia-FISH on edelleen ainoa varteenotettava menetelmä sekabakteerinäytteiden sisältämien bakteerien lajispesifiseksi tunnistamiseksi ja laskemiseksi.

Keksinnön tavoitteena onkin nyt saada aikaan menetelmä, jolla on mahdollista analysoida sekabakteerinäyte, tunnistaa siinä olevat bakteerit ja/tai bakteerilajit sekä mitata niiden osuudet näytteessä. Keksinnön tavoitteena on lisäksi saada aikaan

menetelmä, jolla on mahdollista mitata myös bakteerien ja/tai bakteerilajien konsentraatiot näytteessä. Edelleen keksinnön tavoitteena on saada aikaan tällainen menetelmä joka olisi nopea, halpa ja luotettava.

KEKSINNÖN LYHYT KUVAUS

5 Edellä esitetyt tavoitteet on nyt saavutettu keksinnön mukaisella menetelmällä.

Keksinnön kohteena on menetelmä yhden tai useamman bakteerin ja/tai bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä, joka bakteerinäyte sisältää partikkeleita. Keksinnölle on tunnusomaista se, mitä on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

10 Keksinnön mukaisessa menetelmässä

- a) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutetaan koettimia, joihin on liitetty ensimmäistä fluorokromia, joka absorboi valoa ensimmäisellä aallonpituusalueella,
- 15 b) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutetaan toista fluorokromia, joka absorboi valoa toisella aallonpituusalueella,
- c) bakteerinäyte syötetään virtaussytometriin,
- d) mainittua ensimmäistä fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä ensimmäisellä aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- 20 e) mainittua toista fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä toisella aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- f) detektoidaan näytteen partikkeleista siroava valo ja näytteen partikkeleihin sitoutuneiden fluorokromien fluoresenssi, jolloin saadaan joukko jännitepulsseja, ja
- 25 g) analysoidaan mainittu joukko jännitepulsseja,

ja lisäksi fluorokromit ja monokromaattisen valon aallonpituusalueet on valittu siten, että bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutettujen koettimien fluorokromien ja bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutettujen fluorokromien keskimääräisten fluoresenssien intensiteettien ero on vähintään nelinkertainen logaritmisella asteikolla.

Keksinnön kohteena on lisäksi keksinnön mukaisen menetelmän käyttö bakteerikantojen tunnistamiseen ja niiden osuuksien mittaamiseen.

KEKSINNÖN TARKEMPI KUVAUS

Keksinnön mukaisessa menetelmässä yhden tai useamman bakteerin ja/tai bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä, joka bakteerinäyte sisältää partikkeleita,

- 5 a) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutetaan koettimia, joihin on liitetty ensimmäistä fluorokromia, joka absorboi valoa ensimmäisellä aallonpituusalueella,
- b) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutetaan toista fluorokromia, joka absorboi valoa toisella aallonpituusalueella,
- 10 c) bakteerinäyte syötetään virtaussytometriin,
- d) mainittua ensimmäistä fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä ensimmäisellä aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- e) mainittua toista fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä toisella aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- 15 f) detektoidaan näytteen partikkeleista siroava valo ja näytteen partikkeleihin sitoutuneiden fluorokromien fluoresenssi, jolloin saadaan joukko jännitepulsseja, ja
- g) analysoidaan mainittu joukko jännitepulsseja,

20 ja lisäksi fluorokromit ja monokromaattisen valon aallonpituusalueet on valittu siten, että bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutettujen koettimien fluorokromien ja bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutettujen fluorokromien keskimääräisten fluoresenssien intensiteettien ero on vähintään nelinkertainen logaritmisella asteikolla.

25 Keksinnön mukainen menetelmä siis ratkaisee yllä kuvatut ongelmat ja mahdollistaa virtaussytometrian laajamittaisen käytön sekabakteerinäytteiden sisältämien bakteerilajien lajispesifisessä tunnistamisessa ja bakteerisolujen laskemisessa. Keksinnön mukaisella menetelmällä on siis mahdollista analysoida sekabakteerinäyte, tunnistaa siinä olevat bakteerit ja/tai bakteerilajit sekä mitata niiden osuudet näytteessä, kuten jäljempänä esitetään. Lisäksi keksinnön mukainen menetelmä on nopea, halpa ja luotettava.

Keksinnön mukainen virtaussytometrinen menetelmä bakteerien lajispesifiseksi tunnistamiseksi ja niiden osuuden mittaamiseksi sekabakteerinäytteestä eroaa

merkittävästi aiemmin kuvatuista menetelmistä siinä, että kohdebakteerien, näytteen muiden bakteerien ja taustapopulaation erottaminen sekä näytteen sisältämien bakteerisolujen tarkan lukumäärän ja kohdebakteerien osuuden laskeminen on mahdollista yhdellä analyysillä.

- 5 Olennainen ero Zoetendalin kahta laseria hyödyntävään menetelmään on siinä, että Zoetendalin menetelmässä kumpaakin laseria käytetään koettimissa olevien fluorokromien virittämiseen eli kohdebakteerien erottamiseen näytteen muista bakteereista eikä DNA-värjäytynyttä kokonaisbakteeripopulaatiota voida erottaa taustapopulaatiosta samassa analyysissä. Analysoitavien partikkelien kynnysarvo on
- 10 Zoetendalin menetelmässä säädetty FSC-parametrille. Tämä on johtanut otoksen vääristymään, koska suurella osalla bakteerisoluista FSC-parametrin arvo on jäänyt alle säädetyn kynnysarvon. Heikko otos on todettavissa Zoetendalin julkaisun kuvista. Kahden eri analyysin ja näytteen käyttö heikentää tulosten luotettavuutta olennaisesti. Kahden koettimen käyttö lisää kustannuksia ja osaltaan myös
- 15 heikentää menetelmän luotettavuutta, koska koettimet eivät välttämättä hybridisoi samoja bakteerilajeja. Zoetendalin menetelmässä ei myöskään voida osoittaa, että koettimet todella olisivat sitoutuneet DNA:ta sisältäviin partikkeleihin, koska DNA-värjäytyneitä ja hybridisoituneita bakteereita tarkastellaan eri näytteistä.

- Toisaalta taas nyt kehitetyn menetelmän olennainen ero Wallnerin menetelmään
- 20 nähden on mm. siinä, että Wallner käyttää DNA-värinä UV-aallonpituusalueen fluorokromia ja hybridisaatiokoettimessa sinivihreän aallonpituusalueen fluorokromia. Wallnerin käyttämät fluorokromit ovat niin matalaintensiteettisiä, että näytteen eri populaatiot eivät erotu luotettavasti. Wallnerin kynnysarvona on SSC-parametri, mikä aiheuttaa otosjoukon vääristymän. Wallner poistaa DNA-värjäytymättömät partikkelit analyyseistä tietokoneohjelman avulla, mikä johtaa otoksen lisävääristymään. Menetelmäjärjestelynsä vuoksi Wallner käyttää suuritehoisia ja kalliita satojen milliwattien vesijäähdytteisiä argon-ionilasereita eikä kohdebakteereita silti pystytä erottamaan näytteen muista bakteereista. Wallnerin julkaisussa sekabakteerinäytteenä on käytetty vedenpuhdistuksessa
- 25 käytettävää aktiivilietettä, joka on keinotekoinen sekabakteerinäyte. Aktiivilietteen bakteerit sisältävät enemmän rRNA:ta kuin luonnontilaiset bakteerit, joten Wallnerin käyttämää näytettä ei voi verrata suoliston bakteeriflooran kaltaiseen monimutkaiseen ekosysteemiin. Wallner itsekin toteaa artikkelissaan, että hänen menetelmänsä ei toimi aktiivilietettä monimutkaisempien sekabakteerinäytteiden
- 30 kuten ulosteen tutkimisessa.
- 35

Amannin menetelmä yksilasersovelluksineen taas on perustavalla tavalla erilainen kuin tässä patenttihakemuksessa esiteltävä menetelmä.

Merkittävä etu tämän patenttihakemuksen kohteena olevalla menetelmällä saavutetaan siinä, että kaikkien kolmen populaation: kohdebakteeripopulaation, näytteen muiden bakteerien muodostaman populaation ja taustapopulaation luotettava samanaikainen erottaminen on mahdollista. Tämä nopeuttaa näytteiden analyysiä ja tekee sekabakteerinäytteiden sisältämien bakteerien lajispesifisestä tunnistamisesta ja laskemisesta aiempaa luotettavampaa sekä mahdollistaa näytteen bakteerikonsentraation selvittämisen.

10 Keksinnön mukaisessa menetelmässä hybridisoituneiden koettimien voidaan todistaa todella olevan bakteereissa eikä esimerkiksi taustapopulaation partikkeleissa, koska hybridisoituneet partikkelit voidaan havaita DNA-värjäytyneinä samassa analyysissä. Lisäetu nyt kehitetyssä menetelmässä on se, että menetelmä sopii käytettäväksi ainakin yleisimmissä helposti automatisoitavissa
15 olevista virtaussytometreista. Myös käytettävät fluorokromit ovat hinnaltaan edullisia ja laajalti kaupallisesti saatavilla. Käyttämällä esimerkiksi hybridisaatiokoettiin liitettynä fluorokromina punaisen aallonpituusalueen valoa riittävästi absorboivaa ja emittoivaa fluorokromia ja DNA-värinä (eli DNA:han sitoutuneena fluorokromina) oranssin tai lyhyemmän aallonpituusalueen valoa
20 riittävästi absorboivaa ja emittoivaa fluorokromia, ei haittaavaa energian siirtoa fluorokromien välillä tapahdu. Mikäli fluorokromeja käytettäisiin siten, että hybridisaatiokoettiin liitettäisiin lyhyemmän aallonpituusalueen valoa absorboiva ja emittoiva fluorokromi ja DNA-värinä käytettäisiin pidemmän aallonpituusalueen valoa absorboivaa ja emittoivaa fluorokromia, voisi
25 kohdebakteerien erottumista näytteen muista bakteereista haittaavaa energian siirtoa fluorokromien välillä tapahtua.

Keksinnön mukainen FISH-tekniikalla hybridisoitujen bakteerien virtaussytometrinen analyysi on nopeana, koneellisena ja automatisoitavissa olevana menetelmänä huomattavasti mikroskopia-FISH:ä parempi menetelmä
30 monimutkaisten sekabakteerinäytteiden lajispesifiseksi tutkimiseksi ja laskemiseksi. Virtaussytometrillä pystytään luotettavasti tunnistamaan jopa tuhansia partikkeleita sekunnissa. Aikayksikössä tunnistettujen bakteerien määrä on täten moninkertainen mikroskopiaan nähden. Oikein viritetyn virtaussytometrialaitteiston antama tieto on yksiselitteistä, mikä vähentää inhimillisten tekijöiden aiheuttamaa virhettä.
35 Virtaussytometrialla voidaan myös laskea näytteen sisältämien bakteerien lukumäärä muita menetelmiä tarkemmin ja nopeammin.

Bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamisella tarkoitetaan suhteellisen tai absoluuttisen osuuden mittaamista. Keskimääräinen fluoresenssin intensiteetti (mean fluorescence intensity) lasketaan joko aritmeettisella tai geometrisella tavalla. Edullisesti käytetään geometrista keskiarvoa. Alan ammattilaiselle on selvää, että

5 mikäli jakauma noudattaa oleellisesti Gaussin käyrää, saadaan molemmilla tavoilla sama tulos, mutta mikäli näin ei ole, saadaan geometrisella tavalla kuvaavampi tulos.

Koettimen sitouttamisella tarkoitetaan sitä, että näytteeseen lisätään koetinta ylimäärä ja se sitoutuu ainoastaan niihin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin

10 (rRNA-molekyylit) johon se on tarkoitettu sitoutumaan. Menetelmässä käytetään erityisen edullisesti spesifisiä koettimia ja fluorokromeja, joita tunnetaan useita. Esimerkkejä koettimista on annettu muun muassa julkaisussa Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation; R. I. Amann et al., Microbiological Reviews, 1995, vol. 59, p. 143-169 ja

15 esimerkkejä fluorokromeista on annettu muun muassa julkaisussa Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes. Ylimäärä koetinta voidaan joko pestä pois näytteestä tai jättää näytteeseen, sillä siitä tulevan fluoresenssin ja siroamisen intensiteetti ei ole riittävän korkea häiritäkseen tulosten tulkintaa.

20 Fluorokromi on yleensä liitetty koettimeen jo ennen koettimen sitouttamista bakteerin rRNA-molekyylisiin. Fluorokromi voi olla liitetty koettimeen jo koetinta ostettaessa tai se on mahdollista liittää siihen ennen menetelmän mukaisen käsittelyn aloittamista.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan mainitut koettimet sitoutetaan

25 ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin jotka on valittu joukosta, jossa on 16S-ribosomaaliset RNA-molekyylit ja 23S-ribosomaaliset RNA-molekyylit.

Keksinnön erään toisen suoritusmuodon mukaan vaiheessa d) virtaussytometriin syötettävässä bakteerinäytteessä on lisäksi mikropartikkeleita, joiden sirontaominaisuudet ja/tai fluoresenssiominaisuudet eroavat bakteerinäytteen

30 partikkeleiden sirontaominaisuuksista ja/tai fluoresenssiominaisuuksista. Bakteerinäytteen partikkeleilla tarkoitetaan tässä sen sisältämiä bakteereja, epäpuhtauksia ja muita valoa sirottavia ja/tai fluoresoivia yksiköitä. Keksinnön mukaisessa menetelmässä on mahdollista käyttää lisäksi vakioidun näytemäärän annostelevaa syöttölaitetta, virtausmittaria tai jotakin muuta alan ammattimiehen

35 sinänsä tuntemaa laitetta, jolla on mahdollista mitata analysoidun näytteen määrä.

Tällä tavoin on mahdollista määrittää analysoitavien bakteerien ja bakteerilajien konsentraatio näytteessä. Analysoitavan näytteen sisältämien bakteerisolujen tarkan lukumäärän, bakteerikonsentraation ja kohdebakteerien osuuden laskemiseksi voidaan siis käyttää esimerkiksi fluoresoivia mikropartikkeleita tai vakioisen näytemäärän annostelevaa syöttölaitetta.

Bakteerien kappalemäärä voidaan siis määrittää käyttämällä kaupallisia näyteputkia, jotka sisältävät tunnetun lukumäärän mikropartikkeleita (esimerkiksi TruCount™, valmistaja Becton Dickinson). Mikropartikkelit ovat luotettavasti erotettavissa muista sekabakteerinäytteen partikkeleista sironta- ja fluoresenssiominaisuuksiensa perusteella. Näyteputki sisältää tunnetun määrän mikropartikkeleita ja näyteputkeen annostellaan tunnettu määrä tutkittavaa näytettä. Näytteeseen homogeenisesti jakautuneista mikropartikkeleista tunnistetaan osa. Tunnistettujen mikropartikkelien osuus putken kaikista mikropartikkeleista on suoraan verrannollinen samassa ajassa tunnistettujen bakteerien osuuteen näytteen kaikista bakteereista. Täten näytteen bakteerikonsentraatio voidaan helposti laskea. Toinen vaihtoehto näytteen sisältämien bakteerien lukumäärän laskemiseksi on vakioisen näytemäärän annostelevan syöttölaitteen käyttäminen (esimerkiksi Particle Analysing System PAS, Partec). Syöttölaite annostelee tunnetun tilavuuden näytettä. Annostellun tilavuuden osuus näytteen kokonaistilavuudesta on suoraan verrannollinen tunnistettujen bakteerien osuuteen näytteen kokonaisbakteerimäärästä.

Käytettäessä mainittuja mikropartikkeleita, jotka siis eroavat sironta- ja/tai fluoresenssiominaisuuksiltaan näytteen partikkeleista, voidaan nämä mikropartikkelit lisätä vaiheiden a)-c) mukaisesti käsiteltyyn näytteeseen tai päinvastoin. Samoin mainitut mikropartikkelit on mahdollista lisätä näytteeseen missä tahansa vaiheessa ennen vaihetta d) eli näytteen syöttämistä virtaussytometriin. Erityisen edullisesti käytetään valmiita koeputkia, joissa on ennalta määritelty määrä mikropartikkeleita. Tällaisia putkia valmistaa ja markkinoi muun muassa yritys Becton Dickinson.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä mainitut ensimmäisellä ja toisella aallonpituusalueella olevat monokromaattiset valot voidaan tuottaa yhdellä, kahdella, kolmella tai useammalla valonlähteellä. Mikäli mainitut valot tuotetaan useammalla kuin yhdellä valonlähteellä, voivat nämä valonlähteet olla sijoitettu siten, että niiden tuottamat valonsäteet kohdistuvat laitteessa yhteen, kahteen tai useampaan kohtaan. Mikäli valonsäteet kohdistuvat useampaan kuin yhteen kohtaan, käytetään menetelmässä edullisesti signaalinviivästyslaitteistoa ensimmäisellä valonlähteellä syntyneiden jännitepulssien viivästämiseksi.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan ensimmäinen aallonpituusalue on 600-650 nm ja toinen aallonpituusalue on 350-600 nm. Mainitut ensimmäinen ja toinen aallonpituusalue ovat edullisesti eri aallonpituusalueet, oleellista on että ehto ”
 5 bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutettujen koettimien fluorokromien ja bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutettujen fluorokromien keskimääräisten fluoresenssien intensiteettien ero on vähintään nelinkertainen logaritmisella asteikolla” täyttyy jotta menetelmällä saadaan luotettavia tuloksia. Mikäli valonsäteet kohdistuvat
 10 useampaan kuin yhteen kohtaan, voivat näytteen ensimmäiseksi kohtaaman valonsäteen aallonpituusalueen aallonpituudet olla korkeampia tai alhaisempia kuin näytteen toiseksi kohtaaman aallonpituusalueen aallonpituudet. Mikäli käytetyillä fluorokromeilla on merkittävästi erilaiset fluoresenssiominaisuudet, voivat aallonpituusalueet olla myös samanlaisia. Merkittävällä erolla tarkoitetaan tässä
 15 eroa, jolla edellä mainittu ehto täyttyy. Alan ammattimiehelle on selvää, että muutamalla nopealla kokeella on mahdollista selvittää mitä aallonpituusalueita tulee käyttää. Jäljempänä on kokeellisessa osassa annettu esimerkki aallonpituusalueen valinnasta.

Keksinnön erään erityisen suoritusmuodon mukaan mainitut valonlähteet on valittu
 20 joukosta, jossa on 635 nm:n diodilaser ja 488 nm:n argon-ionilaser.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan tutkittava bakteerinäyte on nisäkkään ruoansulatusjärjestelmästä peräisin oleva näyte. Tällainen näyte voi olla esimerkiksi ihmisen tai eläimen ulostetta. Keksinnön erään toisen suoritusmuodon mukaan tutkittava bakteerinäyte on jätevesinäyte. Lisäksi keksinnön mukaisella
 25 menetelmällä on mahdollista tutkia muun muassa alkuperäiseltä koostumukseltaan kiinteitä mutta analyysiä varten nesteeseen suspensoituja bakteerinäytteitä.

Keksinnön edullisen suoritusmuodon mukainen menetelmä perustuu kahden, analysoitavan näytevirran virtaussuuntaan nähden peräkkäin asetetun, eriaallonpituuksisen laserin ja niille sopivien fluorokromien yhtäaikaiseen käyttöön.
 30 Toinen käytetyistä lasereista on punaisen aallonpituusalueen (600 – 650 nm) laser ja toinen lasereista on oranssin tai lyhyemmän aallonpituusalueen (450 – 600 nm) laser. Toinen menetelmässä käytössä olevista fluorokromeista on liitetty hybridisaatiokoettimeen ja toinen on DNA-väri. Hybridisaatiokoettimessa käytettävän fluorokromin absorbanssispektri on sopiva pidempiaallonpituuksiselle
 35 laserille ja DNA-väriin absorbanssispektri vastaavasti lyhyempiaallonpituuksiselle laserille. Kohdebakteerien nukleiinihappoihin hybridisoituneiden koettimien

fluorokromeja viritetään punaisen aallonpituusalueen laserilla tutkittavan lajin bakteerien erottamiseksi muista bakteereista. Näytteessä oleviin DNA:ta sisältäviin partikkeleihin sitoutunut DNA-väri viritetään oranssin tai lyhyemmän aallonpituusalueen laserilla DNA:ta sisältävien partikkelien erottamiseksi DNA:ta sisältämättömistä partikkeleista. Näytteen sisältämien bakteerisolujen tarkka lukumäärä ja kohdebakteerien osuus kaikista bakteereista lasketaan näytteeseen homogeenisesti suspensoituja fluoresoivia mikropartikkeleita käyttämällä. Menetelmän toimivuus on testattu laskemalla *Bifidobacterium*-suvun bakteerien määrä ihmisulostenäytteistä ja laskemalla samasta analyysistä ihmisulosteen kokonaisbakteerimäärä sekä *Bifidobacterium*-suvun bakteerien osuus ulostenäytteiden kaikista bakteereista, kuten jäljempänä on esitetty kokeellisessa osassa. Verrokkimenetelmänä on käytetty ainoaa laajassa käytössä olevaa sekabakteerinäytteiden analyysimenetelmää eli mikroskopia-FISH:ä. Työläs mikroskopia-FISH suoritettiin erityistä huolellisuutta ja tarkkuutta noudattaen. Menetelmät antavat yhtäpitävät tulokset, mikä todistaa virtauscytometrisen menetelmän toimivuuden. Tässä esitetty menetelmä on siis esimerkki keksinnön mukaisesta menetelmästä.

Keksinnön kohteena on lisäksi tämän menetelmän käyttö bakteerikantojen tunnistamiseen ja niiden osuuksien mittaamiseen. Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan mainittu bakteerikanta on probioottinen bakteerikanta. Alan ammattilaiselle on selvää, että keksinnön mukaista menetelmää on mahdollista käyttää myös minkä tahansa muun bakteerikannan tunnistamiseen, edellyttäen että tunnistettavalle bakteerikannalle on saatavissa menetelmään soveltuvia koettimia ja fluorokromeja. Keksinnön mukaista menetelmää on mahdollista käyttää esimerkiksi prebioottien tutkimiseen.

Teollista ja tieteellistä sovellettavuutta menetelmällä on näin ollen esimerkiksi elintarvike- ja rehuteollisuudessa sekä lääketieteellisessä diagnostiikassa. Lääketieteellisessä diagnostiikassa menetelmällä ei kuitenkaan saavuteta suoraan sellaista tulosta, josta olisi mahdollista diagnosoida tauti, vaan tulosten tulkintaan tarvitaan lääketieteeseen perehtynyt henkilö. Funktionaalisten elintarvikkeiden valmistajat tarvitsevat luotettavan ja nopean sekabakteerinäytteiden analyysimenetelmän, jotta elintarvikkeiden mahdollinen vaikutus esimerkiksi suoliston bakteerikasvuston bakteerilajeihin ja niiden määräsuhteisiin voidaan todeta. Rehuteollisuus pyrkii torjumaan mm. siipikarjan salmonellainfektioita kehittämällä sellaisia rehuja, jotka suosisivat hyvänlaatuisten bakteerien kasvua eläinten suolistossa. Tämä vähentäisi antibioottien käytön tarvetta eläinten

- kasvatuksessa ja vähentäisi antibioottiresistenttien bakteerilajien syntyä. Lääketieteellisessä tutkimuksessa ja kliinisessä diagnostiikassa uusille sekabakteerinäytteiden lajispesifisille analyysi- ja laskentamenetelmille on kasvavaa kysyntää. Ihmisen suolistoflooran tiedetään sisältävän enemmän bakteerisoluja kuin
- 5 mitä ihmisessä on omia eukaryoottisoluja, joten mikrobien ja isäntäelimistön välinen kanssakäyminen on laajaa ja suurelta osin tuntematonta (Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians; W. E. C. Moore and L. V. Holdeman, Applied Microbiology, 1974, vol. 27, p. 961-979). Elimistön mikrobikolonisaatioiden on arveltu olevan useiden etiologialtaan vielä
- 10 tuntemattomien tautien syynä. Esimerkkejä tällaisista sairauksista ovat allergiat ja nivelreuma (Studies on faecal microecology with reference to diet, medication and rheumatoid arthritis; R. Peltonen, väitöskirja, 1994, Turun yliopisto, ja The role of gut microflora in the hygiene hypothesis of allergy; M. Kalliomäki, väitöskirja, 2001, Turun yliopisto).
- 15 Keksintöä on seuraavassa selitetty tarkemmin oheisen piirustuksen avulla.

PIIRUSTUKSEN SELITYS

Piirustus koostuu seuraavista kuvioista:

Kuvio 1 esittää kaavamaisesti keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettyä virtaussytometriä.

- 20 Kuvio 2 esittää kaavamaisesti poikkileikkauksen kuviossa 1 esitetystä virtaussytometristä.

Kuviot 3a, 3b ja 3c esittävät kaavamaisesti signaalin muodostumisen periaatetta virtaussytometriassa.

Kuvio 4 esittää kaavamaisesti signaalinviivästyslaitteiston toimintaperiaatetta.

- 25 Kuvio 5 esittää esimerkin tuloksia.

Kuvio 1 esittää kaavamaisesti keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettyä virtaussytometriä. Kuviossa 1 on esitetty laser 1 ja siitä lähtevä lasersäde 2. Kuviossa on lisäksi esitetty laser 3, josta lähtevän lasersäteen 4 aallonpituus on lyhyempi kuin lasersäteen 2 aallonpituus. Edelleen kuviossa on esitetty virtauskammio 5, jossa näyteliuos 6 ja sitä ympäröivä vaippaliuos 7 virtaavat nuolien 8 osoittamaan suuntaan. Näyteliuos 6 syötetään vaippaliuokseen 7 näytteensyöttöneulan 9 avulla. Näyteliuoksessa 6 on analysoitavia partikkeleita 10,

joka voi olla hybridisoitunut ja DNA-värjäytynyt bakteeri, hybridisoitumaton DNA-värjäytynyt bakteeri, DNA-värjäytymätön DNA:ta sisältämätön partikkeli tai bakteerien lukumäärän laskemisessa apuna käytetty mikropartikkeli. Näyteliuos 6 virtaa lasersäteiden 2 ja 4 poikki niin kapeana, että sen sisältämät partikkelit muodostavat partikkelijonon 11. Partikkelijonon 11 ja lasersäteiden 2 ja 4 leikkauskohdat on merkitty viitenumeroin 12 ja 13, vastaavasti.

Laitteessa on edelleen FSC-detektorina toimiva fotodiodi 14, FL4-detektorina toimiva valomonistinputki 15, FL2-detektorina toimiva valomonistinputki 16 ja SSC-detektorina toimiva valomonistinputki 17. Laitteessa on lisäksi virtaussytometrin optiseen järjestelmään kuuluvia optisia suodattimia ja peilejä 18, joilla partikkeleista siroonnut ja fluoresoiva tietyn aallonpituusalueen valo suodatetaan ja ohjataan detektoreille 14, 15, 16, 17. Laitteessa voi olla myös jäteastia 19, johon näyte analyysin jälkeen johdetaan. Kuvien yksinkertaistamiseksi niistä on jätetty pois FL1- ja FL3-detektorit. Tällainen toimintaperiaate on esimerkiksi yrityksen Becton Dickinson valmistamassa virtaussytometrissä mallia FACSCalibur™.

Kuviossa 2 on esitetty poikkileikkauskuva samasta laitteistosta kuin kuviossa 1. Kuviossa esitetään viitenumerolla 20 lasersäteiden ja näyteliuoksen leikkauspisteessä oleva partikkeli, joka sirottaa ja fluoresoi valoa. Sironnut ja fluoresoitunut valo on esitetty kaaviomaisesti viivoilla 21.

Kuvioissa 3a, 3b ja 3c esitetään signaalin muodostumisen periaate. Kuviossa 3a on esitetty vaihe 1, jossa partikkeli 22 saapuu alhaalta ylöspäin kulkevan nestevirran mukana lasersäteeseen 23. Lasersäde 23 siroaa partikkelista 22 ja fluorokromit virittyvät ja emittoivat emissiospektrinsä mukaista valoa. Virtaussytometrin fotodiodi ja valomonistinputket sekä virtaussytometrin muu elektroniikka muuttaa optiset signaalit analogisiksi jännitepulsseiksi, kuten on kuvattu koordinaatistossa, jossa x-akselilla on esitetty aika ja y-akselilla jännite. Jännitepulssien huippujännite saavutetaan vaiheessa 2, joka on esitetty kuviossa 3b, kun partikkeli 22 on kokonaan lasersäteessä 23. Lasersäteiden 23 sironta ja emittoivien fluorokromien määrä on tällöin suurimmillaan. Kuviossa 3c esitetyssä vaiheessa 3 partikkelin 22 poistuessa lasersäteestä 23 jännite alkaa vastaavasti laskea. Jännitepulssin muodostumiseen kulunut aika riippuu partikkelin 22 koosta ja virtausnopeudesta ja on käytännössä joitakin mikrosekunteja.

Kuviossa 4 esitetään esimerkinomaisesti signaalin viivästämissen periaate kahta laseria käyttävässä virtaussytometrissä. Kuviossa on esitetty partikkeleita 10 jotka

muodostavat näyteliuoksen partikkelijonon sekä ensimmäisen lasersäteen ja partikkelijonon leikkauskohta 12 ja toisen lasersäteen ja partikkelijonon leikkauskohta 13, kuten kuviossa 1. Edelleen x-akselilla on kuvattu jännitepulssit. Ensimmäinen jännitepulssi, joka syntyy partikkelin 10 kohdatessa ensimmäisen eli pidempiaallonpituuksisen laserin säteen leikkauskohdassa 12, on kuvattu viitenumerolla 24. Esimerkissä pidempiaallonpituaisen laserin partikkelissa 10 aiheuttama fluoresenssi detektoidaan FL4-detektorilla, eli jännitepulssi 24 syntyy FL4-valomonistinputkella.

Viitenumerolla 25 esitetään jännitepulssia, joka syntyy partikkelin 10 myöhemmin kohdatessa toisen eli lyhyempiaallonpituuksisen laserin leikkauspisteessä 13. Esimerkissä lyhyempiaallonpituuksisen laserin partikkelissa 10 aiheuttama fluoresenssi detektoidaan FL2-detektorilla, lasersäteen sironta matalissa kulmissa FSC-detektorilla ja lasersäteen sironta suuremmissa kulmissa SSC-detektorilla. X-akselilla esitetty ensimmäisen ja toisen jännitepulssin syntymisen välinen aika t on se aika, joka partikkelilta 10 kuluu ensimmäisen ja toisen laserin välisen matkan kulkemiseen. Jotta partikkelin 10 eri ajassa ja tilassa synnyttämät signaalit tunnistetaan samasta partikkelista peräisin oleviksi, on ensimmäistä jännitepulssia viivästettävä aika t virtapiirissä 26. Viivästetty jännitepulssi on esitetty viitenumerolla 27. Signaalinviivästyksellä laserien samassa partikkelissa 10 eri ajanhetkinä synnyttämät fluoresenssi- ja sirontasignaalit synkronoidaan samaan ajanhetkeen, jotta eri lasereilla samasta partikkelista 10 saadut parametrit kuvautuvat samasta partikkelista 10 peräisin oleviksi.

Kuviossa 5 esitetään 16S rRNA-tekniikalla hybridisoidun, DNA-värjätyn ja mikropartikkeleja sisältävän koeputkeen homogenisoidun ulostenäytteen virtaussytometria-analyysillä saatu pistekuvaaja. Jokainen kuvaajassa oleva piste vastaa yhtä mitattua partikkelia. X-akselin logaritmisella asteikolla mitataan koettimeen liitettyjen fluorokromien fluoresenssin suhteellista intensiteettiä (kanavalla FL4) ja y-akselilla DNA-väri fluoresenssin suhteellista intensiteettiä (kanavalla FL2). Kuvaajan x-akselilla on esitetty jännitepulssin korkeutta (FL4 H, jossa H tarkoittaa korkeutta) ja samoin y-akselilla on esitetty jännitepulssin korkeutta. Kuvaajilla olisi mahdollista esittää myös jännitepulssin leveyttä tai pinta-alaa. Pistekuvaajassa voidaan erottaa neljä eri populaatiota:

1. vain DNA-väri sisältävät partikkelit eli näytteen muut bakteerit kuin kohdebakteerit, esitetty viitenumerolla 28,
2. kummallakin fluoresenssiparametrillä heikosti fluoresoivat partikkelit eli taustapopulaatio, esitetty viitenumerolla 29,

3. sekä koettimen että DNA-väriin sisältävät partikkelit eli kohdepopulaatio, esitetty viitenumerolla 30 ja
 4. voimakkaasti kummallakin fluoresenssikanavalla kuvautuvat mikropartikkelit, esitetty viitenumerolla 31.
- 5 Populaatiot 1. ja 3. muodostavat yhdessä näytteen kokonaisbakteeripopulaation. Ulostenäytteessä taustapopulaatio muodostuu suurimmaksi osaksi ruoansulatuskanavassa sulamattomista kuituisista materiaaleista. Esimerkissä selostetaan tarkemmin miten kuvio on saatu aikaan.

KOKEELLINEN OSA

10 Esimerkki

Keksinnön mukaisella menetelmällä tutkittiin ihmisen ulostenäytteitä hybridisoimalla niitä 16S rRNA-tekniikalla ja DNA-värjäyksellä (kuten on esitetty julkaisussa Quantative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples; P. S. Langendijk et al., Applied and Environmental Microbiology, 1995, vol. 61, p. 3069-3075). Koettimena käytettiin bifidobakteerispesifistä koetinta, joka oli leimattu punaisen aallonpituusalueen Cy5-leimalla (valmistaja yritys Eurogentec), jonka absorptiomaksimi on noin 643 nm ja emissiomaksimi noin 667 nm ja joka on täten tunnistettavissa FL4-detektorilla. DNA-väriä käytettiin oranssin aallonpituusalueen SYTOX™ Orange -väriä (valmistaja yritys Molecular Probes), jonka absorptiomaksimi on noin 547 nm ja emissiomaksimi noin 570 nm ja joka tunnistettiin FL2-detektorilla. SYTOX™ Orangen absorptiospektri on riittävän laaja virittyäkseen 488 nm:n laservalolla. Hybridisoitu ulostenäyte oli homogenisoitu TruCount™-mikropartikkeleita sisältävään koeputkeen (valmistaja yritys Becton Dickinson). Näytteessä oleva hybridisoitunut bifidobakteeri saapui nestevirtauksen tuomana 635 nm:n aallonpituuksisen punaisen diodilaserin optisesti fokusoidun säteen ja hydrodynaamisesti fokusoidun partikkelijonon leikkauspisteeseen. Bakteeriin hybridisoiduissa koettimissa olevat Cy5-fluorokromit absorboivat energiaa lasersäteestä ja fluoresoivat eli emittoivat absorboimaansa energiaa viritysaallonpituuttaan pidempiaallonpituuisena valona joka tunnistettiin FL4-valomonistinputkella ja jännitepulssi alkoi syntyä, kuten on esitetty kuviossa 3a. Bakteerin ollessa vasta osittain ensimmäisen laserin säteessä vain pieni osa bakteerissa olevista koettimien fluorokromeista absorboi energiaa ja emittoi valoa, joten FL4-valomonistinputkella jännitepulssi ei ollut vielä huipussaan. Lasersäteen fluorokromeja virittävä vaikutus oli maksimissaan partikkelin ollessa säteen

fokuskohdan leikkauspisteen keskellä, jolloin jännitepulssi saavutti huippuarvonsa (kuten esitetään kuviossa 3b). Bakterin poistuessa laserin säteestä energiaa absorboivien ja valoa emittoivien koettimiin liitettyjen fluorokromien määrä väheni, joten jännitepulssi laski (kuvio 3c). Syntynyttä jännitepulssia viivästettiin virtapiirissä 22 ± 1 mikrosekuntia. Viivästyksen aikana bakteeri saapui 488 nm:n aallonpituuksisen argon-ionilaserin säteen ja partikkelijonon leikkauspisteeseen. Laserin 488 nm:n aallonpituisen valo viritti bakterin DNA:han sitoutunutta DNA-väriä, jonka fluoresoima viritysaallonpituuttaan pidempiaallonpituisen valo tunnistettiin FL2-valomonistinputkella. Näin syntyi toinen jännitepulssi.

Menetelmässä käytettiin kahta kynnysarvoa, jotta voitiin varmistua siitä, että bakteereiksi laskettavat partikkelit todella olivat bakteereja. SSC-parametrin kynnysarvo oli otoksen kattavuuden varmistamiseksi asetettu niin matalalle, että kaikki bakteerit tulevat tunnistetuksi. Näytteessä oli kuitenkin muitakin partikkeleita kuin bakteereja, joiden SSC-signaali ylitti kynnysarvon. Tämän ongelman ratkaisemiseksi käytettiin toista kynnysarvoa, joka oli asetettu FL2-kanavalle, eli DNA-väriin tunnistavalle kanavalle. SSC-kynnysarvon ylittävien partikkelien oli ennen mitatuksi tuloaan ylitettävä myös FL2-kynnysarvo, joten kahta kynnysarvoa käyttämällä voitiin bakteerit erottaa luotettavasti näytteen muista partikkeleista. Jännitepulssit vahvistettiin logaritmisella vahvistimella, digitoitiin ja analysoitiin virtaussytometriin liitettyllä tietokoneella. Jännitepulssin maksimikorkeus on verrannollinen bakterissa olevien fluorokromien fluoresenssin intensiteettiin. Bakterin FL2- ja FL4-kanavilla aiheuttamat signaalit käsiteltiin tietokoneella ja kuvattiin pistekuvaajassa (kuvio 5). Bakterin ollessa yllä kuvatulla tavalla hybridisoitunut bifidobakteeri, se kuvautui kohdebakteeripopulaatioon (viitenumero 30 kuviossa 5) kuuluvana. Mikäli bakteeri oli jokin hybridisoitumaton bakteeri, se kuvautui näytteen muiden bakterien populaatioon kuuluvana (viitenumero 28 kuviossa 5). DNA-värjäytymättömät partikkelit kuvautuivat taustapopulaatioon (viitenumero 29 kuviossa 5) ja bakterisolujen tarkan lukumäärän laskemiseen käytetyt fluoresoivat mikropartikkelit muodostivat oman populaationsa (viitenumero 31 kuviossa 5).

Taulukossa 1 esitetään viideltä vapaaehtoiselta koehenkilöltä viikon välein kerättyjen kolmen ulostenäytteen analyysien tulokset. Ulostenäytteet oli käsitelty yleisesti tunnetun kiinnitysmenetelmän mukaisesti ja hybridisoitu bifidobakteerispesifisellä koettimella sekä DNA-värjätty (kuten on esitetty julkaisussa Quantative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples; P. S. Langendijk et al., Applied and Environmental Microbiology, 1995, vol. 61, p.

- 3069-3075). Näytteen sisältämä kokonaisbakteerimäärä ja hybridisoituneiden bifidobakteerien määrä ja prosenttiosuus kaikista näytteen bakteereista on laskettu sekä virtaussytometrialla että fluoresenssimikroskopialla. Virtaussytometrinen analyysi tehtiin keksinnön mukaisella menetelmällä ja fluoresenssimikroskooppinen analyysi Langendijkin julkaisun mukaisesti. Kuten Taulukosta 1 nähdään, menetelmät antavat hyvin samansuuntaiset tulokset niin bifidobakteerien osuuden kuin kokonaisbakteerien määrän suhteen. Virtaussytometrillä suoritettussa laskennassa on laskettu noin 20000 bakteeria jokaisesta näytteestä ja yhden näytteen analyysiaika on noin puoli minuuttia. Fluoresenssimikroskopialla suoritettussa laskennassa on laskettu noin 2000 bakteeria per näyte ja aikaa yhden näytteen analysoimiseen on kulunut noin yksi tunti.

Koehenkilö	Aika (viikkoa)	Bakteerit ($10^{10}/g$)		Bifidobakteerien osuus	
		Mikroskopia	Virtaussytometria	Mikroskopia	Virtaussytometria
I	0	2.3	2.1	2.2 %	2.3 %
	1	2.9	2.2	3.7 %	3.5 %
	2	3.0	3.1	1.4 %	0.9 %
II	0	1.0	1.1	6.9 %	7.8 %
	1	1.2	1.5	4.5 %	4.3 %
	2	1.8	1.5	4.5 %	3.9 %
III	0	2.0	2.1	0.31 %	0.0 %
	1	2.8	2.2	0.63 %	0.0 %
	2	2.7	2.5	0.59 %	0.0 %
IV	0	2.8	2.7	1.7 %	1.3 %
	1	2.0	2.6	3.5 %	3.0 %
	2	3.2	2.4	2.9 %	2.3 %
V	0	2.3	3.1	6.1 %	5.9 %
	1	3.3	2.9	7.4 %	8.0 %
	2	2.6	2.8	5.5 %	6.0 %

Taulukko 1

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä yhden tai useamman bakteerin ja/tai bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä, joka bakteerinäyte sisältää partikkeleita, **tunnettu siitä, että**

- 5 a) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutetaan koettimia, joihin on liitetty ensimmäistä fluorokromia, joka absorboi valoa ensimmäisellä aallonpituusalueella,
- b) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutetaan toista fluorokromia, joka absorboi valoa toisella aallonpituusalueella,
- 10 c) bakteerinäyte syötetään virtaussytometriin,
- d) mainittua ensimmäistä fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä ensimmäisellä aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- e) mainittua toista fluorokromia viritetään mainitussa virtaussytometrissä
- 15 toisella aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- f) detektoidaan näytteen partikkeleista siroava valo ja näytteen partikkeleihin sitoutuneiden fluorokromien fluoresenssi, jolloin saadaan joukko jännitepulsseja, ja
- g) analysoidaan mainittu joukko jännitepulsseja,

20 ja siitä, että fluorokromit ja monokromaattisen valon aallonpituusalueet on valittu siten, että bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutettujen koettimien fluorokromien ja bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutettujen fluorokromien keskimääräisten fluoresenssien intensiteettien ero on vähintään nelinkertainen logaritmisella asteikolla.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** mainitut koettimet sitoutetaan ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin jotka on valittu joukosta, jossa on 16S-ribosomaaliset RNA-molekyylit ja 23S- ribosomaaliset RNA-molekyylit.

30 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu siitä, että** vaiheessa d) virtaussytometriin syötettävässä bakteerinäytteessä on lisäksi mikropartikkeleita, joiden sirontaominaisuudet ja/tai fluoresenssiominaisuudet eroavat bakteerinäytteen partikkeleiden sirontaominaisuuksista ja/tai fluoresenssiominaisuuksista.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että siinä käytetään lisäksi vakioidun näytemäärän annostelevaa syöttölaitetta.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ensimmäinen aallonpituusalue on 600-650 nm.

5 6. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että toinen aallonpituusalue on 350-600 nm.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitut ensimmäisellä ja toisella aallonpituusalueella olevat monokromaattiset valot tuotetaan yhdellä valonlähteellä.

10 8. Jonkin patenttivaatimuksista 1-6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitut ensimmäisellä ja toisella aallonpituusalueella olevat monokromaattiset valot tuotetaan vähintään kahdella valonlähteellä.

15 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vähintään kaksi mainituista vähintään kahdesta valonlähteestä ovat etäisyyden päässä toisistaan ja että menetelmässä käytetään signaalinviivästyslaitteistoa ensimmäisellä ja valinnaisesti seuraavilla valonlähteillä syntyneiden jännitepulssien viivästämiseksi.

20 10. Jonkin patenttivaatimuksista 1-9 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitut valonlähteet on valittu joukosta, jossa on 635 nm:n diodilaser ja 488 nm:n argon-ionilaser.

11. Jonkin patenttivaatimuksista 1-10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että bakteerinäyte on nisäkkään elimistönesteinäyte.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että bakteerinäyte on nisäkkään ruoansulatusjärjestelmästä peräisin oleva näyte.

25 13. Jonkin patenttivaatimuksista 1-10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että bakteerinäyte on jätevesinäyte.

14. Jonkin patenttivaatimuksista 1-13 mukaisen menetelmän käyttö bakteerikantojen tunnistamiseen ja niiden osuuksien mittaamiseen.

30 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että bakteerikanta on probioottinen bakteerikanta.

Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on menetelmä yhden tai useamman bakteerin ja/tai bakteerilajin tunnistamiseksi ja vähintään kahden bakteerin ja/tai bakteerilajin osuuden mittaamiseksi bakteerinäytteestä, ja jossa bakteerinäytteessä on partikkeleita. Menetelmälle on tunnusomaista se, että

- a) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutetaan koettimia, joihin on liitetty ensimmäistä fluorokromia, joka absorboi valoa ensimmäisellä aallonpituusalueella,
- b) bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutetaan toista fluorokromia, joka absorboi valoa toisella aallonpituusalueella,
- c) bakteerinäyte syötetään virtaussytometriin,
- d) mainittua ensimmäistä fluorokromia viritetään mainituksa virtaussytometrissä ensimmäisellä aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- e) mainittua toista fluorokromia viritetään mainituksa virtaussytometrissä toisella aallonpituusalueella olevalla monokromaattisella valolla,
- f) detektoidaan näytteen partikkeleista siroava valo ja näytteen partikkeleihin sitoutuneiden fluorokromien fluoresenssi, jolloin saadaan joukko jännitepulsseja, ja
- g) analysoidaan mainittu joukko jännitepulsseja, ja lisäksi fluorokromit ja monokromaattisen valon aallonpituusalueet on valittu siten, että bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin ribosomaalisiin RNA-molekyyleihin sitoutettujen koettimien fluorokromien ja bakteerinäytteen vähintään yhden bakteerin DNA:han sitoutettujen fluorokromien keskimääräisten fluoresenssien intensiteettien ero on vähintään nelinkertainen logaritmisella asteikolla. Keksinnön kohteena on lisäksi mainitun menetelmän käyttö.

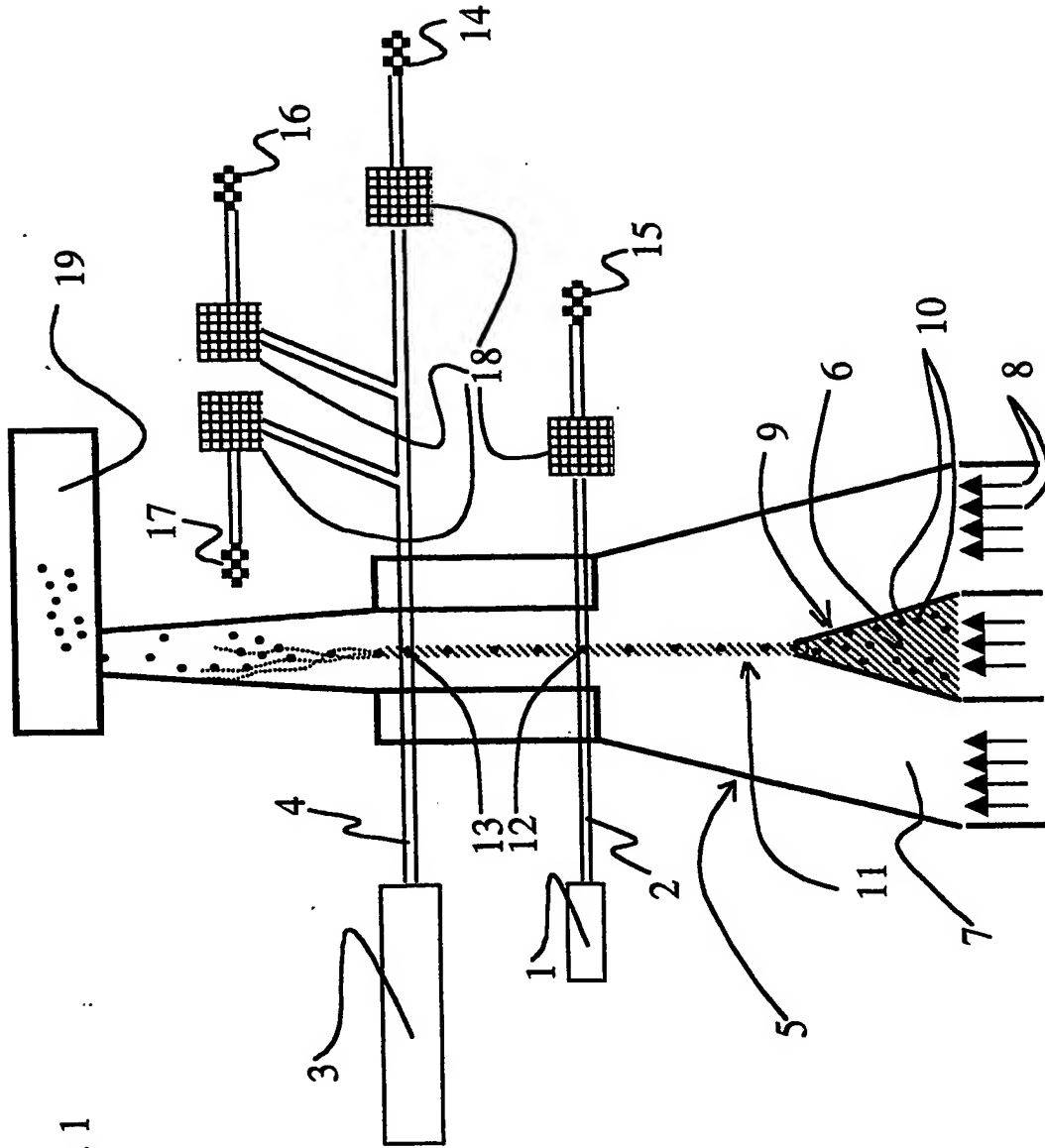
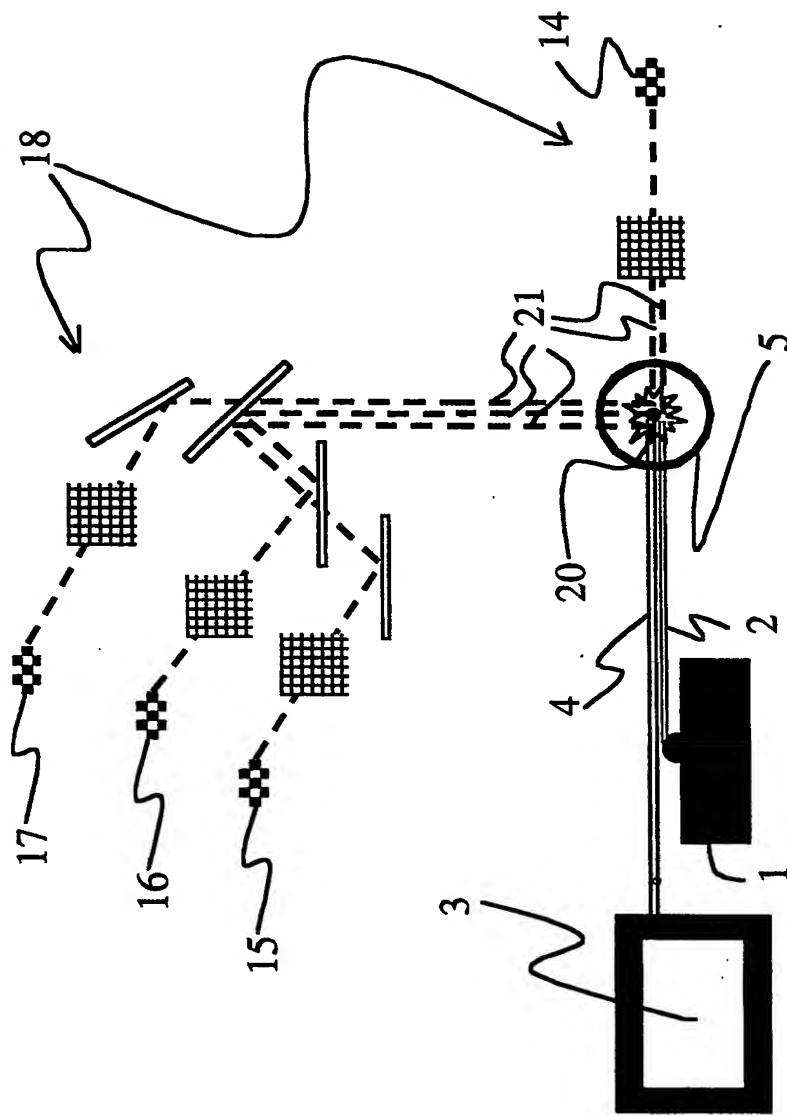


Fig. 1

Fig. 2



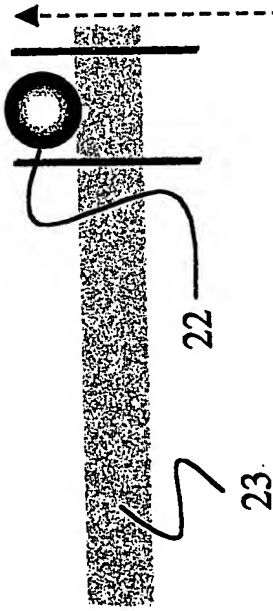
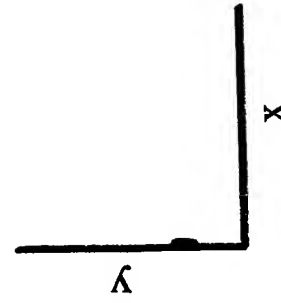
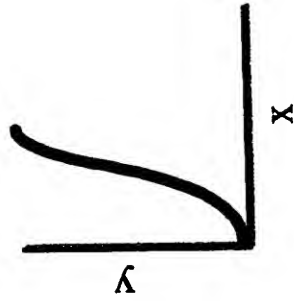
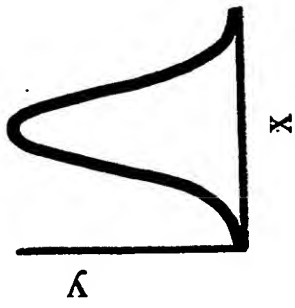


Fig. 3c

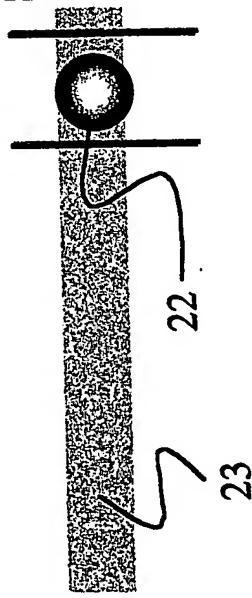


Fig. 3b

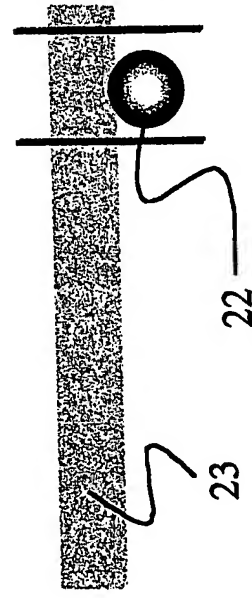


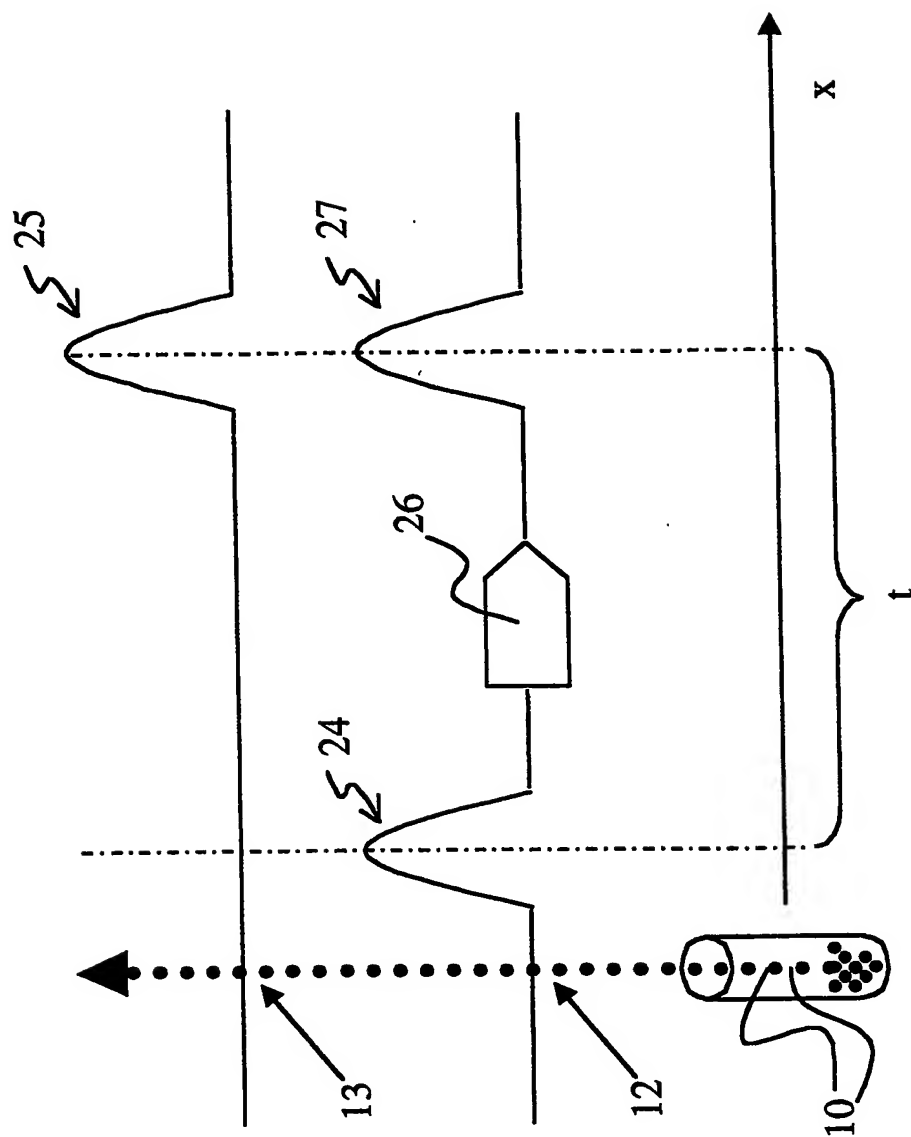
Fig. 3a

07.08.03 02:13:31

4/5

7

Fig. 4



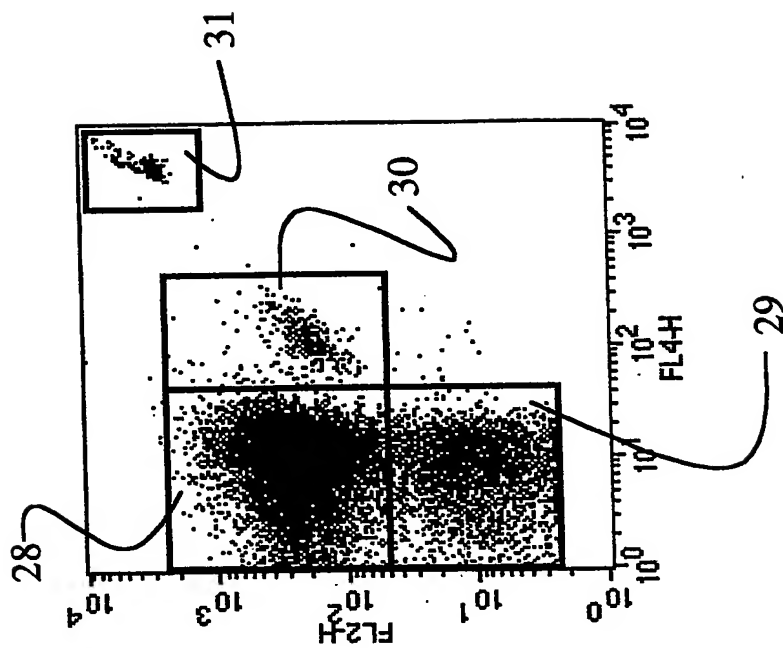


Fig. 5

Best Available Copy